棉铃虫核型多角体病毒的基因组物理图谱

金明浩　　蔡宜权
（中国科学院武汉病毒研究所）

摘要　应用杂交法和混合酶解法组建棉铃虫（*Heliothis armigera*）核型多角体病毒（HaNPV）的基因组物理图谱。确定了 XhoI 酶解位点的全部顺序，部分确定了 PstI 和 BamH I 酶解片段的顺序和它们对 XhoI 位点的相对位置。

关键词　棉铃虫　核型多角体病毒　基因组物理图谱　限制性内切酶　DNA 杂交

棉铃虫是一种杂食性害虫，可为害许多农作物如玉米、烟草、番茄、小麦等。对棉花的危害更是十分严重。利用棉铃虫核型多角体病毒（HaNPV）作为杀虫剂具有良好的效果。组建棉铃虫核型多角体病毒基因组的物理图谱，对更深入研究其基因的结构与功能，对棉铃虫的生防工作都具有一定的意义。

本实验主要采用杂交法和多酶混合水解法（Miller 和 Dawes, 1979; Smith 和 Summers, 1979; Maniatis 等, 1982）对 HaNPV 基因组进行物理图谱的组建。现将结果报道如下。

材料与方法

一、HaNPV 的来源及 NPV-DNA 的提纯

HaNPV 武汉株为多粒包埋核型多角体病毒。由本所二室提供。

NPV 的提纯采用常规方法。取经病毒感染罹病死亡的虫尸腐烂后的液体经反复差速离心与蔗糖梯度离心，得到初步提纯的 NPV，然后加入 10% SDS，使其终浓度为 0.1%，37℃ 保温 30 分钟，稀释10倍，离心去除 SDS，再经几次差速离心，光镜下可见均一的多角体。

直接从多角体中抽提 DNA（金明浩和蔡宜权，1985）。将纯化的 NPV 悬浮于 TE 缓冲液中(0.02M Tris·HCl pH7.6, 0.001M EDTA)，用 Proteinase K, SDS, EDTA 处理，然后用苯酚和氯仿进行抽提，乙醇沉淀。DNA 溶解 TE 缓冲液中，置于 4℃ 备用。

二、DNA 的限制性内切酶谱分析

1. 单酶与双酶消化　DNA 用 XhoI、PstI、BgLI BstEII、EcoRI、BamHI 和 ALuI 等限制性内切酶消化。每微克 DNA 加入酶量 1—3 单位。各酶解反应体系参照《Molecular Cloning》(Maniatis, 1982)，具体条件与笔者前段工作相同(金明浩等，1985)。

双酶消化分为两组：XhoI + PstI, XhoI + BamHI。其酶解反应体系与 XhoI 酶解反应体系相同（Maniatis, 1982）：XhoI + PstI 双酶解是 1 微克 DNA 中加入 4 单位 XhoI,

本文于 1985 年 4 月收到。

3 单位 PstI，37℃ 反应 2 小时。 XhoI + BamHI 双酶解是 1 微克 DNA 中加入 4 单位 XhoI，3 单位 BamHI，37℃ 反应 2 小时。

电泳采用 0.75% 琼脂糖凝胶按常规方法进行。

2. DNA 酶解片段克分子数的测定 DNA 各酶解片段克分子数通过扫描测定(Smith 和 Summers，1978)。用 Joyce Loebl 扫描仪对电泳图谱负片扫描，通过定积分近似计算求出各扫描峰面积。

梯形公式：$$A = \frac{\delta}{2}[y_0 + y_n + 2(y_1 + y_2 + \cdots + y_{n-1})]$$

取 $\delta = 0.5$，从扫描图上查出各峰 y_0—y_n 的数值，根据上述梯形公式求出各峰面积 A。以各峰面积 A 的对数对该片段的电泳迁移率作图，相同克分子数的片段在同一直线上。

3. DNA 酶解片段分子量的测定 取 HindIII，SalI 所消化的 λ DNA 作为标准，以各片段的分子量对该片段的电泳迁移率作图制成标准曲线。 根据酶解 DNA 片段的电泳迁移率，从标准曲线上查出近似分子量。

三、DNA 片段的分子杂交

1. DNA片段的洗脱与回收 将电泳后的琼脂糖凝胶用溴化乙锭染色，在紫外分析仪下切下所需的 DNA 带。将含有 DNA 带的凝胶放入透析带中，内装少量的 0.5×TE 缓冲液，排清气泡，在 0.5×TE 电泳缓冲液中泳动 0.5 小时，当 DNA 全部出胶后反向电泳 1 分钟。 电洗脱所得到的 DNA 溶液通过 NACS 层析柱进行纯化和浓缩。NACS 层析柱为美国 BRL 公司出品。用 2 毫升 0.2M NaCl + TE 缓冲液洗柱，再用 1 毫升 2M NaCl + TE 缓冲液进行洗脱，收集体积为 100 微升。DNA 通过乙醇沉淀，然后溶解于 10 微升 TE 缓冲液中。

2. Southern 印迹及杂交 DNA 探针采用缺口转移法 (Nick translation) 制备。DNA 杂交参照 Southern 的方法 (Southern，1975)。具体条件与笔者前段工作相同(金明洁和蔡宜权，1985)。

四、双酶混合酶解法确定各酶解位点

在单、双酶混合酶谱中存在着三类片段(见图5)：①消失片段：它们仅存在于单酶谱中。②中间片段：同时存在于单酶谱和双酶谱中，并具有相同的迁移率。③末端片段：仅存在于双酶谱中。将双酶混合酶解考虑成两步单酶水解过程，DNA 被第一种酶水解后产生的酶解片段进而被第二种酶水解，可得到两种可能的结果：一是 DNA 酶 1 片段中存在着 1—n 个酶 2 的位点。这类片段会从单酶谱中消失，故称为消失片段；同时在双酶谱中产生新的片段即末端片段。另一是 DNA 酶 1 片段中不存在着酶 2 位点，它们与末端片段共同组成消失片段，并且总是位于消失片段的中部，故称为中间片段。由此可知每条消失片段是由两条末端片和 0—(n − 1)条中间片段组成。因此从单、双酶混合酶解图谱中找出中间片段和末端段，通过它们的随机组合和分子量积加，与消失片段分子量重合，从而确定消失片段的组成。根据两种酶的各消失片段的重叠区域，使片段得以延伸，最终得出各组酶解片段的顺序。

结 果 与 分 析

一、HaNPV 基因组的限制性内切酶谱

HaNPV-DNA 分别用 BglI、BstEII、EcoRI、XhoI，PstI 和 AluI 消化后产生的电泳图谱见图 1，各酶解片段分子量见表 1。由此可知 HaNPV 基因组分子量为 75.8×10^6。

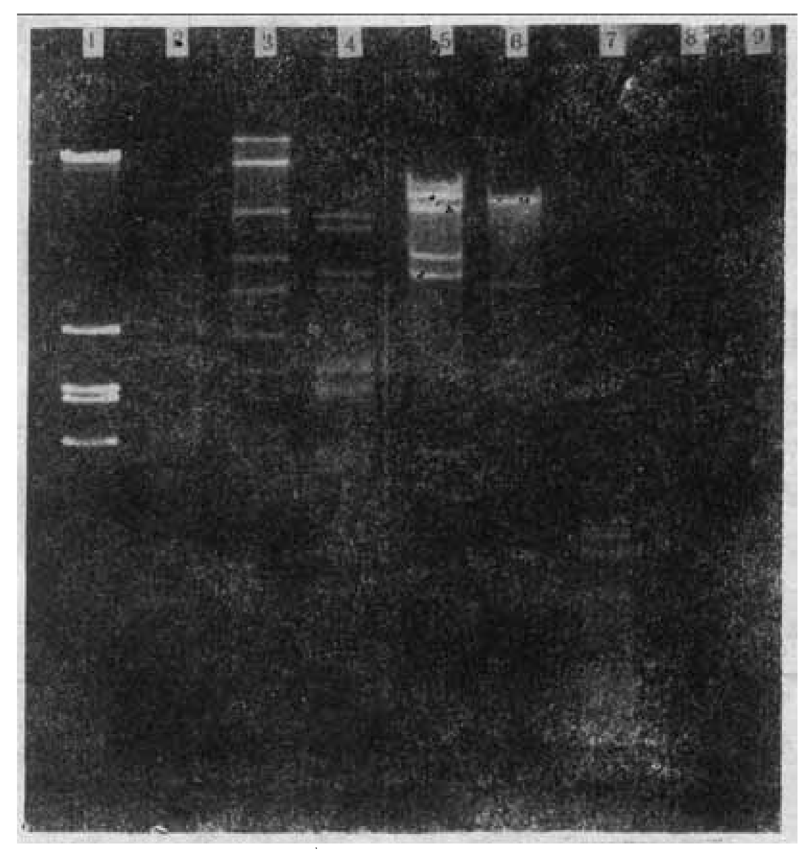


图 1　**HaNPV-DNA 的限制性内切酶谱**

1. EcoRI　2. BglI　3. BstEII　4. EcoR I　5. XhoI　6. Pst I　7. AluI　8. HindIII$^{\lambda}$　9. SalI$^{\lambda}$

二、DNA 片段的克分子数

用 Joyce Loebl 扫描仪(波长 620nm)对 DNA 的 PstI 酶谱进行扫描，并以 PstI 和 BglI 酶谱作为对照。结果(图 2、表 2)表明 PstI 酶谱的第一条带 (P_1) 为双克分子带，即它是由两条分子量十分接近的 DNA 片段所组成，分别表示为 P_1^A，P_1^B。

三、杂交法判断酶解位点

用 Xho I 消化 DNA，经琼脂糖凝胶电泳分离后将每个片段分别回收制成探针。同时 DNA 用 Pst I 消化，电泳分离后转移至硝酸纤维素滤膜上，然后分别与各个 Xho I 酶解片段探针杂交。所得结果如图 3。由图中可见：

表 1 HaNPV-DNA 各酶解片段的分子量

片段 \ 分子量 (MW,×10⁶) \ 内切酶	Bgl I	BstEII	EcoR I	Xho I	Pst I	BamH I
1	10.7	23	8.5	41.8	31.5	31.3
2	9.5	14	7.8	16.5	31.5	11.8
3	7.8	8.6	5.8	8.4	6.8	8.8
4	6	6.4	5.6	7	3.9	8.2
5	4.9	5.4	4	2.1	2.0	5.1
6	4.19	4.5	3.9*			3.7
7	3.2	3.9	3.9*			2.35
8	3.05*	3.1	3.8			2.1
9	3.05*	2.9	3.6*			1.2
10	2.95	2.45	3.6*			0.8
11	2.70	1.78	3.5			
12	2.55		2.85			
13	2.2		2.75			
14	1.9		2.7			
15	1.65*		2.65*			
16	1.65*		2.65*			
17	1.5		2.15			
18	1.45		1.95			
19	1.3		1.78			
20	1.23		1.6			
21	1		0.75			
22	0.8					
23	0.7					
总量 MW×10⁶	75.97	76.03	75.83	75.8	75.7	75.35

* 双克分子带

1. X_2 片段与 P_1、P_2、P_3 杂交。即 P_1、P_2、P_3 为相邻片段，其排列方式有三种可能:

P_3 P_1 P_2 / X_2　　P_1 P_2 P_3 / X_2　　P_1 P_3 P_2 / X_2

由于 X_2 片段的分子量小于 P_1；即它不可能完全包含 P_1 片段，故第一种结构是不存在的，说明 P_2、P_3 一定是两条相邻的片段。

2. P_4 只与 X_1 杂交而不与其他任何 Xho I 片段杂交，说明 P_4 完全包括在 X_1 片段中。并且由各片段分子量可知 X_1 一定与两条 P_1 片段 (P_1^A、P_1^B) 都具有同源性，因此推测 P_1^A、P_1^B、P_4 的排列为:

P_1^A P_4 P_1^B / X_1

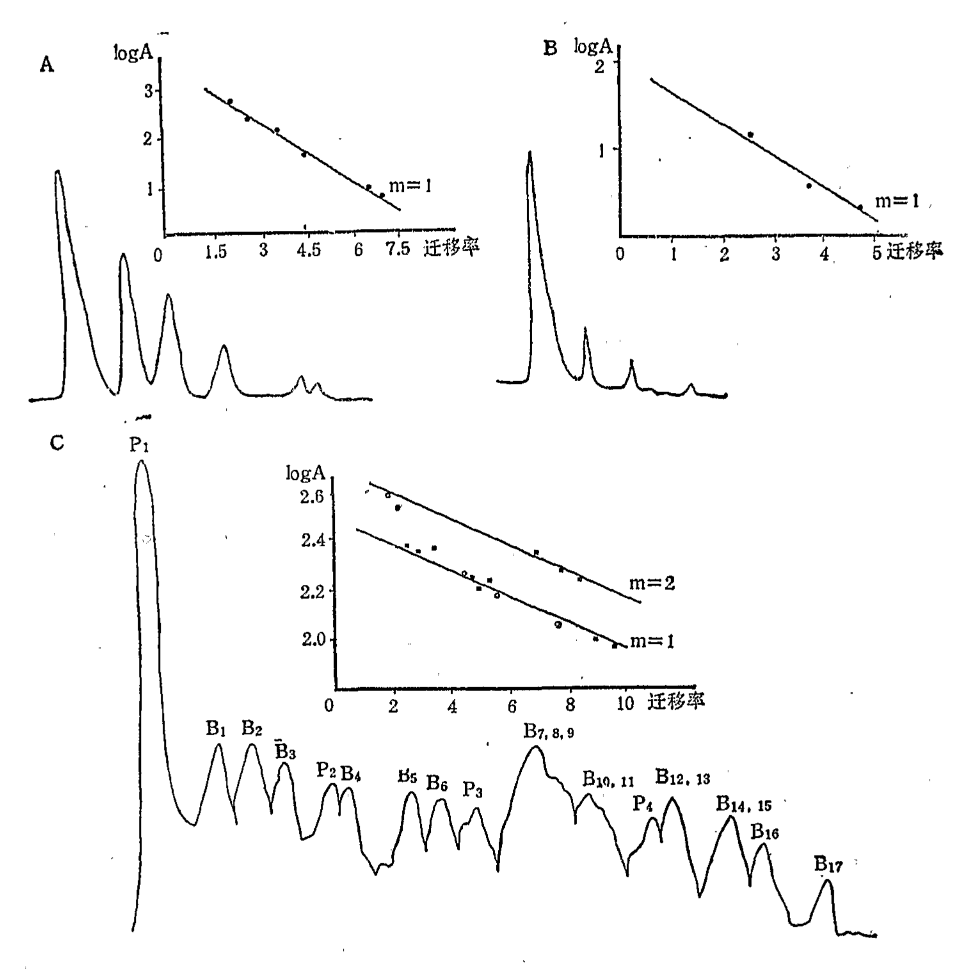


图 2 HaNPV-DNA 酶谱的扫描图

A. HindIII[1] B. PstI C. Pst I 和 Bgl I。PstI 和 BglI 分别降解 DNA 取等量的酶解样品加于同一样品槽中电泳，对所得酶谱进行扫描。P_1—P_4 表示 PstI 各带，在坐标中用○表示。B_1—B_{17} 表示 BglI 各带，在坐标中用■表示。m 表示各片段克分子数。

因而得出 DNA 的初步图谱如图 4。

四、双酶混合酶解判断各酶解位点

用 XhoI ＋PstI 混合消化 DNA，同时分别用这两种酶作单酶消化，所得酶谱以及各片段分子量见图 5。由图 5 可见：XhoI ＋PstI 双酶谱中第 3 条带[用 $(x+p)_3$ 表示，如此类推]、第 4、5、6、9、10 条带为中间片段，其余为末端片段。PstI 单酶谱中的 P_1、XhoI 单酶谱中的 X_1、X_2 为消失片段。通过中间片段和末端片段的分子量随机组合与积加确定各消失片段的组成：

$$\mathbf{X_1} = (x+p)_1 + (\mathit{x}+\mathit{p})_{10} + (x+p)_2$$

$$\mathbf{X_2} = (x+p)_7 + (\mathit{x}+\mathit{p})_5 + (\mathit{x}+\mathit{p})_6 + (x+p)_8$$

P_1 由于是双克分子带，其情况较为复杂，存在四种可能结构：

注：黑体字表示消失片段。印刷体为末端片段。斜体为中间片段。

表 2 HaNPV-DNA 各酶解片段的峰面积与迁移率

PstI

峰	面积(A)	LogA	迁移率
P_1	153.8	2.19	1.6
P_2	10.35	1.20	2.7
P_3	3.2	0.51	3.7
P_4	2.07	0.316	4

Pst I 与 Bgl I

峰	面积(A)	Log A	迁移率
P_1	400	2.6	2.1
P_2	224	2.35	2.9
P_3	220	2.34	3.25
P_4	202	2.36	3.6
P_5	183	2.26	4.1
P_6	167	2.22	4.35
P_7	161.5	2.21	5.1
P_8	174	2.24	5.4
P_9	155.3	2.19	5.85
P_{10}	330.5	2.52	6.3
P_{11}	208.5	2.32	7.0
P_{12}	107	2.03	7.7
P_{13}	189	2.28	7.9
P_{14}	169	2.23	8.5
P_{15}	92	1.96	8.9
P_{16}	63	1.8	9.6

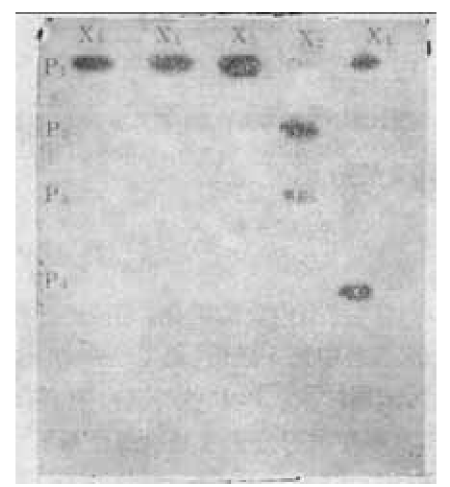


图 3 HaNPV-DNA 的 Xho I 酶解片断与 Pst I 酶谱杂交图

X_1—X_5 分别代表 Xho I 酶解各片段(探针)

P_1—P_4 分别代表 Pst I 酶解各片段

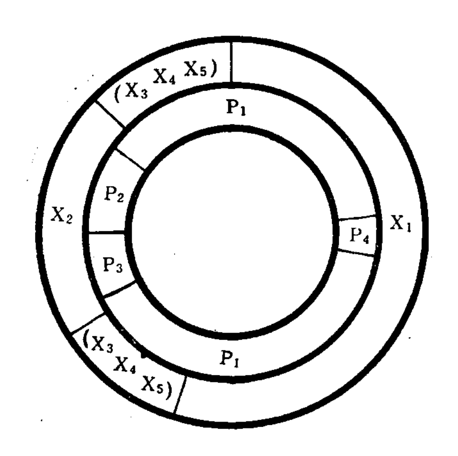


图 4 用 Xho I 消化 DNA 得到的 HaNPV-DNA 初步图谱

1. $\mathbf{P}_1^A = (x+p)_1 + (x+p)_9 + (x+p)_7$

$\mathbf{P}_1^B = (x+p)_2 + (x+p)_3 + (x+p)_4 + (x+p)_8$

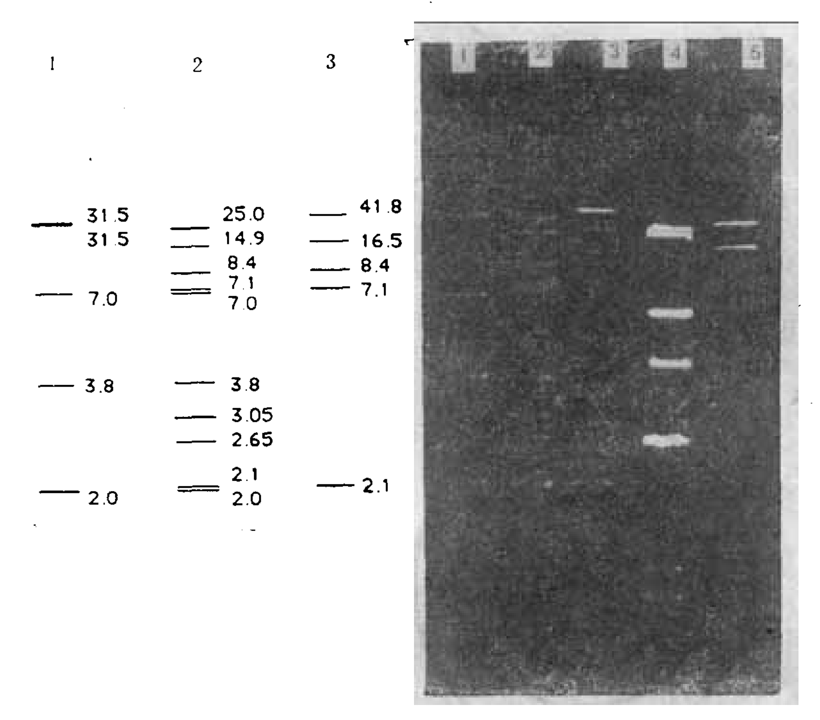


图 5　XhoI + Pst I 双酶解图谱

右图：1. Pst I　2. Xho I + Pst I　3. Pst I　4. HindIII$^{\lambda}$　5. SalI$^{\lambda}$　左图中数字表示各片段分子量

2. $P_1^A = (x+p)_1 + (x+p)_4 + (x+p)_7$

$P_1^B = (x+p)_2 + (x+p)_3 + (x+p)_9 + (x+p)_8$

3. $P_1^A = (x+p)_1 + (x+p)_9 + (x+p)_8$

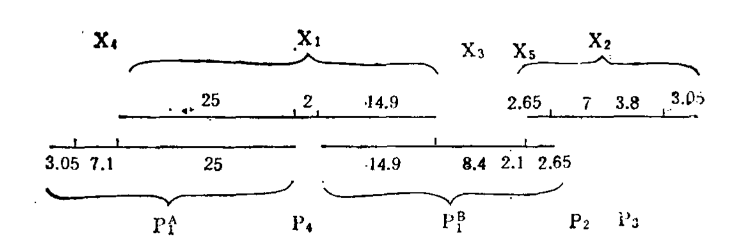
$P_1^B = (x+p)_2 + (x+p)_3 + (x+p)_4 + (x+p)_7$

4. $P_1^A = (x+p)_1 + (x+p)_4 + (x+p)_8$

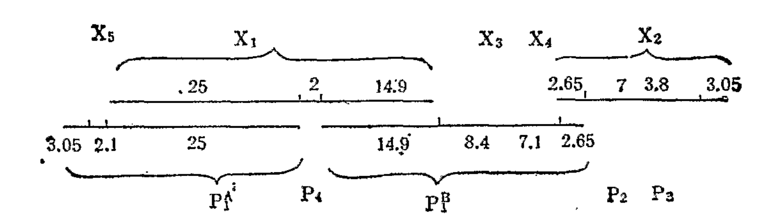
$P_1^B = (x+p)_2 + (x+p)_3 + (x+p)_9 + (x+p)_7$

在后两种情况下产生的物理图谱分别与前二者相同，可排除。通过各消失片段的重叠区域，使片段得以延伸。

在第一种情况下：



在第二种情况下：



由此得出两组物理图谱的可能结构（图 6）。

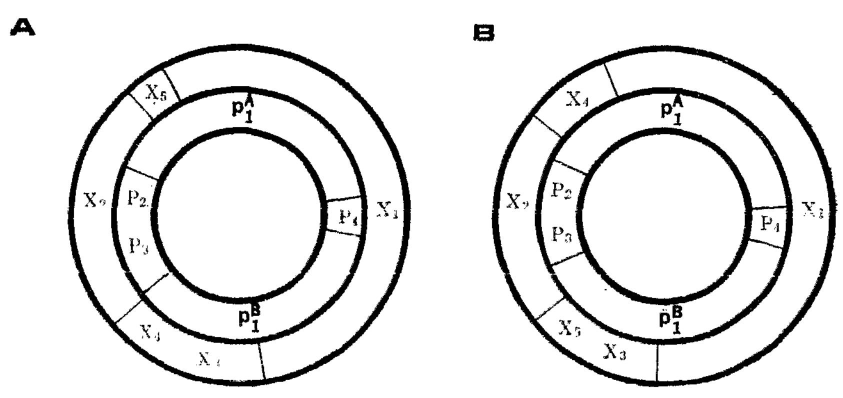


图 6 Xho I + Pst I 混合消化 DNA，得到的 HaNPV-DNA 的两组可能结构图谱

为了进一步确定哪一组结构为正确，选用 Xho I + BamH I 作双酶消化，所得结果见图 7。通过中间片段与末端片段的随机组合，可确定各消失片段的组成：

$\mathbf{X}_1 = (X + B)_1 + (X + B)_2 + (X + B)_6 + (X + B)_{10} + (X + B)_{15} + (X + B)_4$

$\mathbf{X}_2 = (X + B)_5 + (X + B)_8 + (X + B)_{13} + (X + B)_{14} + (X + B)_9$

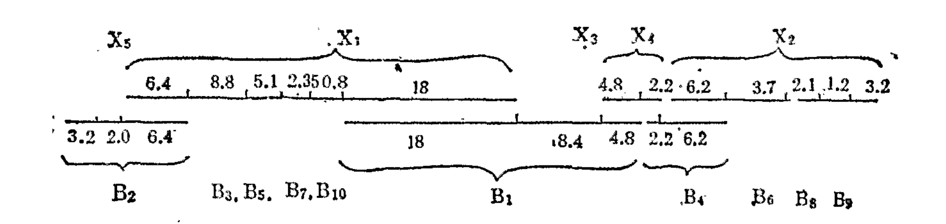
$\mathbf{X}_4 = (X + B)_7 + (X + B)_{11}$

$\mathbf{B}_1 = (X + B)_1 + (X + B)_3 + (X + B)_7$

$\mathbf{B}_2 = (X + B)_4 + (X + B)_{12} + (X + B)_9$

$\mathbf{B}_3 = (X + B)_5 + (X + B)_{11}$

通过两种酶各消失片段的重叠区域，可使片段延伸。从而得出：



由此确定了 Xho I 酶解片段的全部顺序，得知图 6A 所示的结构是正确的。综合以上所得结果，组建出 HaNPV 基因组的物理图谱如图 8。

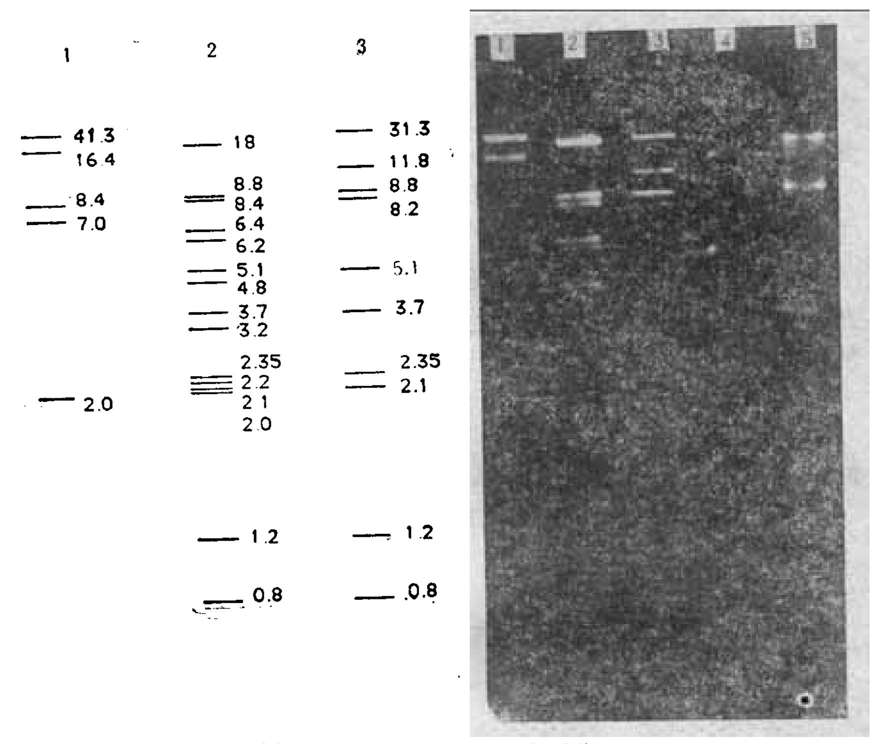


图 7 XhoI + BamHI 双酶解图谱

右图：1. XhoI 2.XhoI + BamHI 3.BamHI 4. HindIII[1] 5. SalI[1] 左图中数字表示各片段分子量

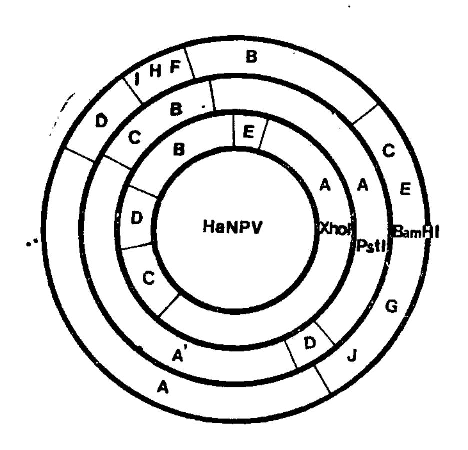


图 8 HaNPV 的基因组物理图谱

讨 论

在组建 HaNPV 基因组的物理图谱过程中，由于PstI酶谱中的第一条带为双克分子带，因而产生了一些麻烦。对于线性 DNA 分子，可通过末端标记进行部分酶解来确定 P_1^A、P_1^B 的准确分子量和位置。但 HaNPV-DNA 是环状分子。本实验除了采用前述几种内切酶外，还分别用 HindIII. BglII. SalI HpaI 等酶进行消化，均得到多条带带谱，

没有找到单切点的内切酶，故不能采用部分降解法来确定 P_1^A 和 P_1^B。本实验通过两次双酶混合酶解和杂交技术，确定了 XhoI 酶解位点的全部顺序。这也反证了 P_1^A 和 P_1^B 的位置是正确的。

不同浓度的琼脂糖凝胶具有不同的分辨率。0.7% 的凝胶通常可测量大小在 10×10^6 或 15×10^6 以下的片段。HaNPV-DNA 的 BglI 和 EcoRI 酶解片段分子量在此范围内，可认为所得 HaNPV-DNA 的分子量 75.8×10^6 基本上是准确的。对于其他内切酶酶解片段，可直接从标准曲线上查出除最大片段外的全部片段的分子量，用 DNA的总分子减去这些片段分子量之和即为最大片段分子量。杂交实验证明了由这种方法所得的分子量做出的物理图谱是正确的。

参 考 文 献

金明洁、蔡宜权 1985 七株昆虫核型多角体病毒基因组同源性的测定。病毒学报 1：370—8。

Maniatis, T. et al. 1982 Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Lab.

Miller, L. K., Dawes. 1979. Physical map of the DNA genome of *Autographa Califorlica* NPV. *J. Virol.* **29**: 1044—55.

Simth, G. E., Summers, M. D. 1979. Restrsiction maps of five *Autographa Califorlica* MNPV variants, *Trichoplusia ni* MNPV, and *Galleria mellonella* MNPV DNAs with restriction endonucleases KpnI, BamHI, SacI, XhoI, and EcoRI. *J. Virol.* **30**: 828—838.

Simth, G. E., Summers, M. D. 1978. Analysis of Baculevirus genomes with restriction endonucleases. *Virology* **89**. 517—27.

Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503—17.

A PHYSICAL MAP OF *HELIOTHIS ARIMGERA* NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS GENOME

JIN MING-JIE CAI YI-QUAN

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica)

A physical map of the 76×10^6 dalton circular DNA genome of *Heliothis arimgera* NPV has been constructed with the methods of hybridization and multiple restriction endonucleases digestion. The complete order of XhoI restriction enzyme sites has been determined. The PstI, BamHI fragments have been partially ordered, and their general locations related to XhoI map have been determined.

Key words *Heliothis armigera*——nuclear polyhedrosis virus——genome physieal map——restriction endonuclease——DNA hybridization